

スク評価を行う際のディシジョンツリーが示されており、リスク評価のポイントは、以下の通りである。

- ① ウイルスは、既知か未知か？
- ② 核酸は、ウイルス粒子に含まれているか？
- ③ 核酸は断片か、それとも完全長か？
- ④ 感染性粒子はあるか？
- ⑤ 感染性粒子はヒトの細胞に感染するか？
- ⑥ 感染性粒子はヒトに感染するか？
- ⑦ 感染性ウイルスは、ヒトに病気を起こすか？
- ⑧ ウイルスは、ヒトからヒトへ伝染性があるか？

RotaTeq[®]および Rotarix[®]の PCV 迷入事例をディシジョンツリーに当てはめた場合のリスク評価を以下に示す(図2)。Merck の RotaTeq[®]の場合は、ウイルス粒子に結合した PCV 核酸の断片のみしか検出されていないため、ヒトへの感染のリスクは極めて低いと評価された。GSK の Rotarix[®]の場合は、感染性の粒子が検出されたが、ヒトの細胞への感染は認められなかったため、ヒトへの感染のリスクは非常に低いと評価された。以上のように、RotaTeq[®] および Rotarix[®]とも健康被害のリスクは低く、FDA, EMA および WHO の判断を支持する結果となった。

E. 結論

バイオ医薬品へのウイルスの迷入を防ぐには、出発物質の更に注意深い品質管理が必要である一方、我々はウイルスに満ち溢れた世界で生きているのも事実である。そのため、可能な限り対策を講じて、新たな迷入ウイルス検出系及び次世代シーケンサー等による高感度・網羅的なウイルス核酸検出系により、予期せぬ迷入が判明する事例が増加することが予測される。その場合の安全性評価において、本稿で報告した PCV の迷入に対する製造業者及び規制当局の対応は参考となり、WHO により示されたリスク評価のディシジョンツリーは有用と考えられる。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文

- 1) 日本 PDA 製薬学会バイオウイルス委員会 SALLY 分科会. 第2章:生物薬品の品質、安全性の向上に関する検討. 過去の事例に学ぶ

ウイルス汚染の防止対策 - 血漿分画製剤の感染事例とその対策. PHARM TECH JAPAN 2013, 29(7):45-50.

2. 講演

- 1) 日本 PDA バイオウイルス委員会 SALLY 分科会 バイオ医薬品の安全性確保 1.1 ウイルス迷入の安全性評価 第20回日本 PDA 製薬学会年会 平成25年12月3-4日 (東京)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当しない

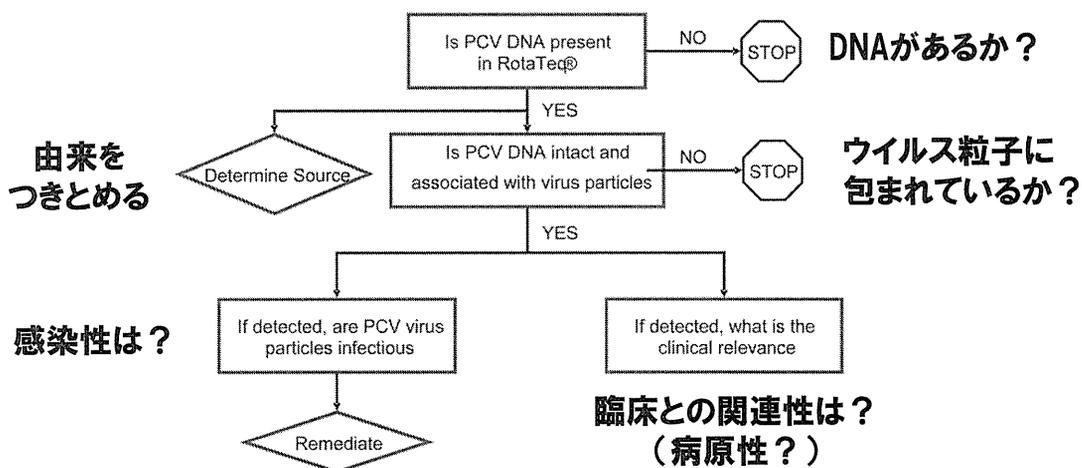
2. 実用新案

該当しない

3. その他

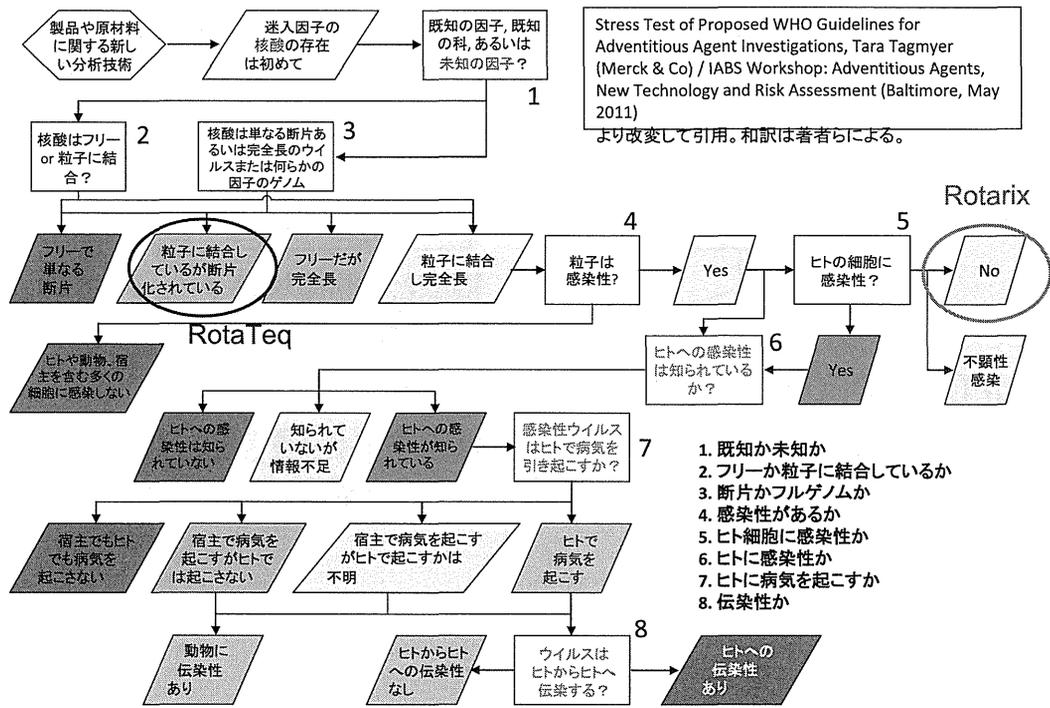
該当しない

図1 RotaTec®におけるPCV評価のディシジョンツリー



- ▶ qPCRでのPCV DNAフラグメントの検出
- ▶ ある程度の長さのフラグメントが検出された場合は、Porcine kidney (PK-15) cellを利用した*in vitro*感染性試験を実施

図2 ウイルス迷入時のリスク評価のディシジョンツリーとそれに基づいた RotaTeq® 及び Rotarix® のリスク評価



細胞組織加工医薬品におけるウイルス検出法に関する研究

研究分担者：橋井 則貴 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第一室長

研究協力者：中澤 志織 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

研究要旨 細胞表面に発現したウイルス受容体の発現量を指標とした細胞組織加工医薬品のウイルス感受性評価手法を開発することを目的として、モデル細胞を用いて、細胞表面ウイルス受容体の定性的定量的スクリーニング手法の開発を検討した。ビオチン化とストレプトアビジンを利用した細胞表面タンパク質の濃縮を行うことで、効率良く細胞表面に分布するウイルス受容体を回収し、ウイルス受容体の検出効率を高めることができることが明らかとなった。本分析法は、細胞組織加工医薬品に発現するウイルス受容体の定性的定量的解析手法として有用であることが実証された。

A. 研究目的

細胞組織加工医薬品のウイルス安全性確保においては、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「ヒト（自己・同種）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及びのウイルス安全性の確保に関する指針」、「ヒト（自己・同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」、及び「ヒト（自己・同種）iPS（様）細胞加工医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」に記載されたウイルス安全性に関する規定を順守して、原材料、製造工程、及び最終製品の各段階で、適切なウイルス安全性試験を行う必要がある。例えば、バンク化を伴う同種ヒト幹細胞のウイルス試験については、ICHQ5A「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオ医薬品のウイルス評価」に関するガイドラインを参考にすることとされている。また、ヒト同種由来細胞でバンク化されておらず、ウインドウ・ピリオドが否定できず、HBV、HCV、及びHIV等

が製造工程中に増殖する可能性のある細胞を用いる場合にも、中間製品、及び最終製品等について適切なウイルス試験を実施する必要がある。同ガイドラインには、内在性及び外来性ウイルス検出及び確認のために推奨される試験として、感染性試験及び電子顕微鏡観察（レトロウイルス試験）、*In vitro* 試験、*In vivo* 試験、並びに抗体産生試験等のさまざまな試験法が例示されている。適切なウイルス試験を設定するためには、その細胞の内在性ウイルス、関連ウイルスに加えて、どのような外来性ウイルスの迷入があるか、あるいは感染リスクが高いのかを把握することが重要である。既知ウイルスのスクリーニング法としては、PCR法、抗ウイルス抗体を用いた免疫学的方法、及び核酸増幅法等が知られている。これらの手法は確立された手法であり、特異的且つ高感度に標的ウイルスの有無を確認することができる。一方、ウイルス感染は、ウイルスが細胞表面の受容体（表1）に

結合することが引き金となり起こることから、受容体発現量は、細胞のウイルス感受性を評価の指標の一つとして利用できる可能性がある。特に、iPS細胞のように、細胞の特性解析が不十分な細胞については、ウイルス安全性を確保するために重要である。そこで本研究では、細胞表面に発現したウイルス受容体の発現量を指標とした細胞組織加工医薬品のウイルス感受性評価手法を開発することを目的として、モデル細胞を用いて、細胞表面ウイルス受容体の定性的定量的スクリーニング手法の開発を検討した。

B. 研究方法

B.1. 材料等

CHO-DG44 細胞

0.1% Pluronic F-68 を添加した DG44 培地 (GE Healthcare) に、 2.0×10^5 cells/mL となるように CHO-DG44 細胞を播種し、7 日間、旋回培養 (125 rpm, 37°C, 5% CO₂ 気流下) した。

B.2. 細胞表面タンパク質のビオチン化

回収した CHO-DG44 細胞 (1.4×10^7 個) を PBS で 3 回洗浄し、5 mL の PBS で再懸濁したのち、1 mL の 10 mM sulfo-NHS-LC-biotin (Thermo Fisher Scientific) 水溶液を加え、4°C で 2 時間にわたり転倒混和しながらビオチン化反応を行った。PBS で 3 回洗浄した後、100 mM glycine/PBS でビオチン化を停止させ、300 μ L の RIPA buffer (0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 使用前に 1 μ L の Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) を

添加) を加え、4°C で約 1 時間転倒混和し、15,000 rpm で 10 分間遠心した遠心上清を RIPA lysate として回収した。

B.3. ビオチン化タンパク質の精製と消化

Streptavidin agarose resin 50% slurry (Thermo Fisher Scientific) 10 μ L (レジン 5 μ L に相当) を PBS で洗浄したのち、液相を 30 μ L の RIPA lysate に置換し、室温で 1 時間混和した。レジンを 100 μ L の RIPA buffer で 1 回、純水で 3 回洗浄し、液相を 100 μ L の guanidine buffer (8 M guanidine-0.5 M EDTA (pH 8.6)) または Tris buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.5)) に置換し、2 μ L の 1 M DTT を加え 65°C で 20 分間、続けて 4.8 μ L の 1 M モノヨード酢酸ナトリウムを加え遮光しながら室温で 40 分間反応させ、還元カルボキシメチル化を行った。反応後、0.5 mL の純水でレジンを 3 回洗浄し、液相を 100 μ L の 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) で置換し、終濃度 5 ng/ μ L の修飾トリプシンを加え 37°C で 16 時間消化した。消化物をフィルター (Empty Micro Bio-Spin, Bio-Rad) で濾過しレジンを取り除いた。また、crude lysate として、RIPA lysate 30 μ L に 70 μ L の guanidine buffer を加え、同様の条件で還元カルボキシメチル化を行い、PD minitrap G-25 (GE Healthcare, 28-9180-07) で脱塩、凍結乾燥の後、100 μ L の Tris buffer で溶解し、終濃度 5 ng/ μ L の修飾トリプシンを加え 37°C で 16 時間消化した。いずれも消化物は Speed vac で乾燥させ 25 μ L の 0.1% ギ酸に溶解し、5 μ L (細胞数約 2.8×10^5 個相当) を LC/MS 分析に供した。

B.4. 液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS)

分析条件は以下の通りである。

(1) LC

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResources)

分析カラム: L- column2 C18 column (0.075 mm × 150 mm, φ 3 μm, CERI)

展開溶媒 A 及び B として, 2%及び 90% のアセトニトリルを含む 0.1%ギ酸溶液を使用し, 流速 0.3 μL/min, B 溶媒 5-65%のリニアグラデーションで分離を行った.

(2) MS

装置: LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific)

分析条件は以下のとおりであった.

キャピラリー電圧: 2.0 kV

マスペクトルの範囲: m/z 450-2000

タンデム MS (MS/MS) コリジョンエネルギー: 30%

(3) タンパク質同定

Proteome Discoverer 1.4.0.288 (Thermo Fisher Scientific) を用いデータベース (RefSeq, NCBI reference sequence database) 中の *Cricetulus griseus* を種とするエントリーに対し, 検索エンジンとして Sequest を用いて, タンパク質同定を行った. 修飾としてシステイン残基のカルボキシメチル化(+ 58.005 Da, static), およびメチオニン残基の酸化(+ 15.995 Da, dynamic)を指定した. ビオチン化ペプチドは, 固相化ストレプトアビジンに残留し, 測定試料中にはほぼ無いと推測されるので, LC-ビオチン化 (+ 339.162) は考慮しなかった.

C. 研究結果及び考察

C.1. Crude lysate からのウイルス受容体の探索

CHO-DG44 細胞の RIPA lysate を, そのま

ま還元カルボキシメチル化, 及びトリプシン消化した後, LC/MS を行った(crude lysate, 図 1A). 取得した MS データを用いて, タンパク質同定を行った結果(図 2A), 同定された総タンパク質数 (532 個) に対する膜タンパク質, 及び細胞内タンパク質の割合は, それぞれ 27%及び 19%であった. 膜タンパク質が最も多く同定されたものの, 細胞内タンパク質が量的に多く, ウイルス受容体はほとんど検出されなかった(表 2. Crude).

C.2. ビオチン化膜タンパク質の濃縮条件の検討

膜タンパク質の回収方法として, 超遠心分離法があるが, 微量タンパク質の回収には適さない場合がある. また近年, さまざまな界面活性剤を用いた膜タンパク質抽出キットが販売されているが, 脱界面活性剤・脱塩操作後に, 回収率が低下することが懸念されている. そこで RIPA lysate から, 細胞表面に存在するタンパク質のみを効率的に回収するために, 細胞膜透過性を持たない分子で標識する過程を追加した. 可溶化前の細胞を Sulfo-NHS-LC-biotin 溶液中で振盪することで細胞表面タンパク質のビオチン化を行い, 可溶化後に固定化ストレプトアビジンでビオチン化タンパク質を精製したのち, 溶出を省き固定化ストレプトアビジンに結合させたままの状態です還元カルボキシメチル化と消化を行ってペプチドにすることで, 凝集・沈殿による膜タンパク質の逸失の抑制を図った. また, 通常の変性剤には, タンパク質を変性させ反応効率を高めるために, グアニジンなどの変性剤を含む溶媒が用いられる

が、グアニジンが固定化ストレプトアビジンを変性させビオチン化タンパク質の流失を起こす危険が想定されたため、還元カルボキシメチル化時の溶媒として、8 M のグアニジンを含む guanidine buffer を用いた試料に加え、より穏和な条件として緩衝剤のみを含む Tris buffer を用いた試料を別に用意した。

ビオチン化とストレプトアビジンでの細胞表面タンパク質の濃縮を行ったことで、同定された全タンパク質数は減少したものの(Tris buffer 358 個, guanidine buffer 305 個)、膜タンパク質数の割合は、27%から 32% (Tris buffer)または 43% (guanidine buffer)に上昇した(図 2)。また、ウイルス受容体タンパク質として、intercellular adhesion molecule 1 (Coxsackievirus A13, A18, A21, 及び rhinovirus), low-density lipoprotein receptor (Rhinovirus), MHC class I antigen Hm1-C4, MHC class I antigen Hm1-C5 (以上, Simian virus 40), neural cell adhesion molecule 1 (Rabies virus), nucleolin (respiratory syncytial virus), dystroglycan (Old World arenaviruses), chondroitin sulfate proteoglycan 4 (Vaccinia virus, Circovirus, 及び HSV1 and 3), 及び sulfated glycoprotein 1 (17 種, 表 1 参照)が同定され、同定数は 1 個から 9 個に改善された(表 2)。還元カルボキシメチル化に用いる緩衝液については、guanidine buffer で還元カルボキシメチル化を行ったもので特にウイルス受容体由来ペプチドの検出数が多い(表 2)、Tris buffer 系では細胞内タンパク質の検出数が多かった(図 2 B, C)。このことから、ストレプトアビジン-ビオチン間の結合は guanidine buffer 中で還元カルボキシメチル化を行ってもなお十分に維持されており、

むしろ或る程度の変性条件を適用して非特異吸着物や凝集物を除去する方が、効率良く細胞表面のウイルス受容体を回収できるものと推定される。

C.3. 同定されたウイルス受容体の質量スペクトル

表 2 に挙げたウイルス受容体由来ペプチドの MS スペクトルおよびそれらの代表的な ms/ms スペクトルを図 3 に示す。本分析で同定されたウイルス受容体由来ペプチドを指標とすることで、各ウイルス受容体の相対定量が可能になると思われる。

D. 結論

本研究では、モデル細胞として、遺伝子組み換え医薬品の産生細胞として汎用される培養細胞のひとつである CHO 細胞 DG44 を用いて、ビオチン化とストレプトアビジンを利用した細胞表面タンパク質の濃縮を行うことで、効率良く細胞表面に分布するウイルス受容体を回収し、ウイルス受容体の検出効率を高めることができることを示した。また、CHO 細胞 DG44 に Icam-1, LDL 受容体などのウイルス受容体が発現していることを見出した。

上述の方法は培養された細胞一般に広く応用可能であると考えられ、本研究で用いた遺伝子組み換え医薬品産生細胞に限らず、細胞組織加工医薬品に発現するウイルス受容体も同様の手法で定性的定量的に解析することができるかと期待できる。

E. 健康危険情報

該当事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表 該当事項なし
2. 学会発表 該当事項なし

G-1. 実用新案登録 該当事項なし

G-2. その他 該当事項なし

表 1 References

1. "Principles of virology" Flint SJ *et al.* (2nd ed. chapter 5, Table 5.1)
2. "Viral Entry into Host Cells" *Advances in Experimental Medicine and Biology* **790**, Stefan Pohlmann and Graham Simmons Eds.
3. "Adenovirus receptors" Niklas Arnberg, *Trends in Pharmaceutical Sciences* 2012 **33**(8):442-8.
4. "RSV fusion: time for a new model." Mastrangelo P and Hegele RG, *Viruses* 2013 **5**(3):873-85.
5. "Thirty years on: HIV receptor gymnastics and the prevention of infection" Weiss RA, *BMC Biology* 2013, **11**:57.
6. "Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus." Noyce RS and Richardson CD, *Trends in Microbiology* 2012 **20**(9):429-39.
7. "Filovirus entry: a novelty in the viral fusion world." Hunt CL *et al.*, *Viruses* 2012 **4**(2):258-75.
8. "Ephrin-B2 and ephrin-B3 as functional henipavirus receptors." Xu K *et al.*, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2012 **23**(1):116-23.
9. "SARS-CoV and Emergent Coronaviruses: Viral Determinants of Interspecies Transmission" Bollesa M *et al.*, *Current Opinion in Virology* 2011 **1**(6): 624–634.
10. "The cell biology of receptor-mediated virus entry" Grove J and Marsh M, *The Journal of Cell Biology* 2011 **195**(7):1071–1082.

Receptor	Virus	Ref
Neuropilin-1 (Vascular endothelial cell growth factor 165 receptor, CD antigen CD304)	Human T cell leukemia virus 1	10
NPC1 (Niemann-Pick C1 protein)	Ebola virus	10
claudin-1 (Senescence-associated epithelial membrane protein)	HCV	10
LDLR (Low-density lipoprotein receptor)	Rhinovirus (minor group)	10
CD4 (T-cell surface glycoprotein CD4)	Human immunodeficiency virus type 1	1
	Human immunodeficiency virus type 2	1
	Simian immunodeficiency virus	1
	Human herpesvirus 7	1
Transferrin receptor 1 (CD71)	New World arenaviruses	10
	Mouse mammary tumor virus	1
Icam-1 (CD54, Intercellular adhesion molecule 1)	Coxsackievirus A13, A18, A21	1
	Major group rhinovirus (91 serotypes)	1, 10
MHCI	Simian virus 40	1
MHCII	Adenovirus type 5 (subgroup C)	1
	Epstein-Barr virus	10
Hsp70	Japanese encephalitis virus	10
Low-affinity nerve growth factor receptor (CD271, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16)	Rabies virus	1
	Coxsackievirus A21	1
DAF (Decay-accelerating factor, CD55)	Coxsackievirus B1, B3, B5	1
	Coxsackievirus B	10
	Echovirus 3, 6, 7, 11 to 13, 20, 21, 24, 29, 33	1
	Echovirus 70	1
GLUT-1 (Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1, Glucose transporter type 1, erythrocyte/brain, HepG2 glucose transporter)	Human T cell leukemia virus 1	10
N-CAM-1 (CD56, Neural cell adhesion molecule)	Rabies virus	1
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, (CD66a, Bgp, biliary glycoprotein)	Mouse hepatitis virus	1
Aminopeptidase N (CD13)	Human coronavirus, 229E	1
	Transmissible gastroenteritis virus	1
Poliovirus receptor (Pvr, NECL-5, CD155)	Poliovirus types 1-3	1
	Poliovirus	10
CD46 (membrane cofactor protein, trophoblast leukocyte common antigen, TLX)	Adenovirus (B1, B2, D)	3
	Measles virus	1
VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1, INCAM-100, CD106)	Encephalomyocarditis virus	1
	Adenovirus (C)	3
nucleolin (protein C23)	RSV (respiratory syncytial virus)	4
CD21 (Complement receptor type 2, Cr2, Complement C3d receptor, Epstein-Barr virus receptor, EBV receptor)	Epstein-Barr virus	1, 10
	Gibbon ape leukemia virus	1
Pit1 (Pituitary-specific positive transcription factor 1)	Feline leukemia virus T	1
	Feline leukemia virus B	1
	Adenovirus (B1, B2)	3
CD80 (activation B7-1 antigen, BB1, CTLA-4 counter-receptor B7.1, B7)	Adenovirus (B1, B2)	3
	Sindbis virus	1, 10
Laminin receptor (40S ribosomal protein SA, 37 kDa laminin receptor precursor, 37LRP, 37/67 kDa laminin receptor, LRP/LR, 67 kDa laminin receptor, 67LR, Laminin receptor 1, LamR, Laminin-binding protein precursor p40, LBP/p40)	Adenovirus (B1, B2)	3
CD86 (activation B7-2 antigen, B70, BU63, CTLA-4 counter-receptor B7.2, FUN-1)	Adenovirus (B1, B2)	3
CCR5 (C-C chemokine receptor type 5, C-Cr5, CC-CKR-5, CCR-5, CHEMR13, HIV-1 fusion coreceptor, CD antigen CD195)	HIV	5, 10
Ephrin-B2 (EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 5, LERK-5, HTK ligand, HTK-L)	Henipavirus	8, 10
Asialoglycoprotein receptor GP-2	Sendai virus	1
CD81 (26 kDa cell surface protein TAPA-1, Target of the antiproliferative antibody 1, Tetraspanin-28, Tspan-28)	HCV	10

Receptor	Virus	Ref
CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4)	HIV	5, 10
	Human immunodeficiency virus type 2	1
	Feline immunodeficiency virus	1
Car (coxsackievirus-adenovirus receptor)	Adenovirus 2	10
	Adenovirus subgroups A, C, D, E, F	1
	Coxsackievirus B1 to B6	1
Par-1 (proteinase-activated receptor 1)	Porcine endogenous retrovirus A	1
Par-2 (proteinase-activated receptor 2)	Porcine endogenous retrovirus A	1
Pit2	Feline leukemia virus B	1
	Amphotropic murine leukemia virus	1
SLAM (Signaling lymphocytic activation molecule, CD150)	Measles virus	1, 10
Lysosome membrane protein 2 (85 kDa lysosomal membrane sialoglycoprotein, LGP85, CD36 antigen-like 2, Lysosome membrane protein II, LIMP II, Scavenger receptor class B member 2, CD antigen CD36)	Enterovirus 71	10
α -Dystroglycan (Dystrophin-associated glycoprotein 1 [Cleaved into: Alpha-dystroglycan (Alpha-DG); Beta-dystroglycan (Beta-DG)])	Old World arenaviruses	10
desmoglein-2 (DSG2, cadherin family member 5, HDGC)	Adenovirus (B1, B2)	3
PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1)	Enterovirus 71	10
Nectin-1 (Poliovirus receptor-related protein 1, Herpes virus entry mediator C, Herpesvirus entry mediator C, HveC, Herpesvirus Ig-like receptor, HlgR, Nectin-1, CD antigen CD111)	Herpes simplex virus 1/2	10
RDr	RD114	1
Ephrin-B3 (EPH-related receptor transmembrane ligand ELK-L3, EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 8, LERK-8)	henipavirus	8
occludin	Coxsackievirus B	10
	(HCV)	10
EGFR (epidermal growth factor receptor)	Vaccinia virus	1
Scavenger receptor class B member 1 (SR-B1, CD36, CD36 and LIMPII analogous 1, Collagen type I receptor, thrombospondin receptor-like 1)	HCV	2, 10
Nectin-2 (Poliovirus receptor-related protein 2, Herpes virus entry mediator B, Herpesvirus entry mediator B, HveB, Nectin-2, CD antigen CD112)	Herpes simplex virus 1/2	10
HVEM (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14, Herpes virus entry mediator A, Herpesvirus entry mediator A, HveA, Tumor necrosis factor receptor-like 2, TR2, CD270)	Herpes simplex virus 1/2	10
Hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVcr-1, kidney injury molecule 1, KIM-1, T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 1, TIMD-1, T-cell immunoglobulin mucin receptor 1, TIM-1, T-cell membrane protein 1)	Hepatitis A virus	1
	Ebolavirus (EBOV)	7
	Marburgvirus (MARV)	7
	Hepatitis A virus	10
Nectin-4 (Poliovirus receptor-related protein 4, Ig superfamily receptor LNIR, Nectin-4 [Cleaved into: Processed poliovirus receptor-related protein 4])	Ebola virus	10
	Measles virus	6, 10
ACE2 (angiotensin converting enzyme 2)	SARS coronavirus	9, 10
L-SIGN (C-type lectin domain family 4 member M, CD209 antigen-like protein 1, DC-SIGN-related protein, DC-SIGNR, Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 2, DC-SIGN2, Liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing non-integrin, CD antigen CD299)	SARS coronavirus	10
DC-SIGN (CD209, C-type lectin domain family 4 member L, Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 1, DC-SIGN1)	Dengue virus	2
	HCV	2
	CMV	2
	KSV (HHV8)	2
	HIV	2
	HTLV	2
	Bunyavirus	10
	Ebola virus	2

Receptor	Virus	Ref
CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4)	HIV	5, 10
XPr1	Xenotropic and polytropic murine leukemia virus	1
scavenger receptor class A member 2, macrophage receptor MARCO, macrophage receptor with collagenous structure)	Adenovirus (C)	3
Langerin (CD207, C-type lectin domain family 4 member K)	HIV	2
JAM (Junction adhesion molecule)	Reovirus	10
	Orthorheovirus	1
Flvcr	Feline leukemia virus C	1
$\alpha 2\beta 1$ (Vla-2, CD49b)	Echovirus 1 and 8	1
$\alpha 2\beta 1, \alpha 4\beta 1$	Human rotavirus	1
$\alpha 2\beta 1, \alpha V\beta 3$	Echovirus	2
$\alpha 3\beta 1, \alpha 2\beta 1$	Human herpesvirus 8	1
	KSV (HHV10)	2
$\alpha M\beta 2$	Adenovirus type 2 (subgroup C)	1
αV integrins	Adenovirus type 9 (subgroup C)	1
	Adenovirus 2	10
$\alpha V\beta 3$ (vitronectin receptor)	Foot and mouth disease virus (FMDV)	2
	Coxsackievirus A9	1
	Echovirus 22	1
$\beta 3$ integrins	Hantavirus	1
integrins	Rotavirus	10
Chondroitin sulfate proteoglycans	Vaccinia virus	2
	Circovirus	2
	HSV1 and 3	2
GM1	SV40 polyomavirus	10
Histo-blood group antigens	Norovirus	10
	Vaccinia virus	2
	Adenovirus	2
	Norovirus	2
	Circovirus	2
	Dengue virus	2
	HCV	2
	CMV	2
Heparan sulfate proteoglycans	HSV1 and 2	2
	KSV (HHV9)	2
	RSV	2
	Rhinovirus89	2
	Foot and mouth disease virus (FMDV)	2
	HIV	2
	HTLV	2
Lactoseries tetrasaccharide c	John Cunningham polyomavirus	10
	Adenovirus	2
sialic acid	Rhinovirus87	2
	Rotavirus	10
	Influenza A	10
$\alpha 2,3$ sialic acid	Sendai virus	2
	Influenza A virus (avian)	2
$\alpha 2,6$ or $\alpha 2,3$ sialic acid	Rotavirus	2
$\alpha 2,6$ sialic acid	Influenza A virus (human)	2

表1 ウイルス受容体分子と、それらを利用することが知られているウイルス

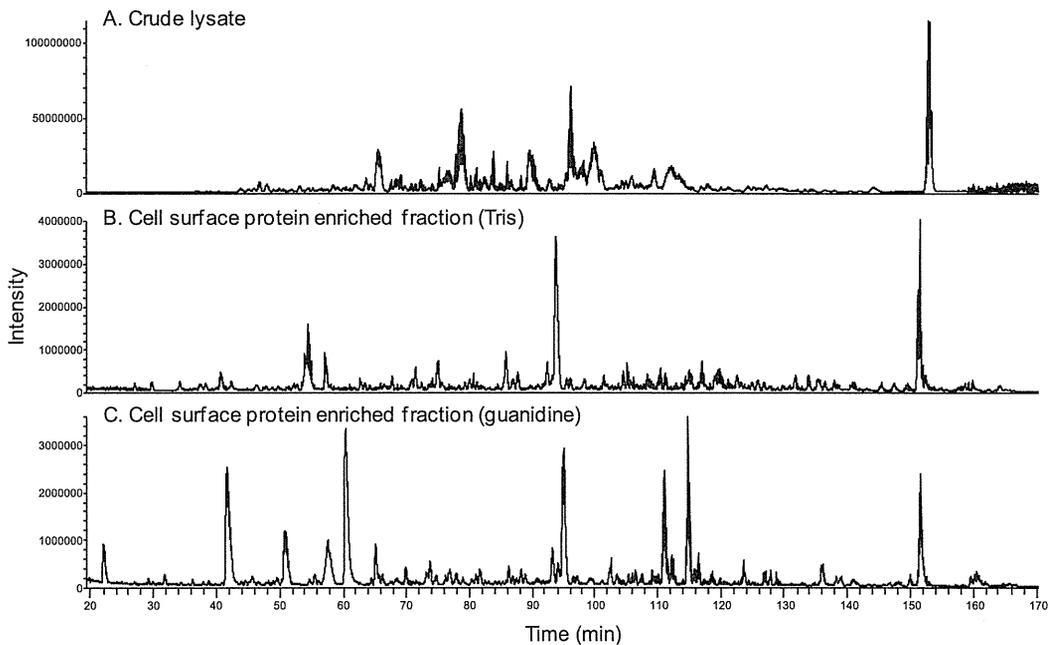


図1 CHO細胞 RIPA buffer 抽出物のベースピーククロマトグラム. Crude lysate (A)またはビオチン化と固相化streptavidinで精製したもの(B, C)に、還元カルボキシメチル化とトリプシンでの消化を行った。ただし還元カルボキシメチル化をBでは guanidine buffer 中で、Cでは Tris buffer 中で行った。

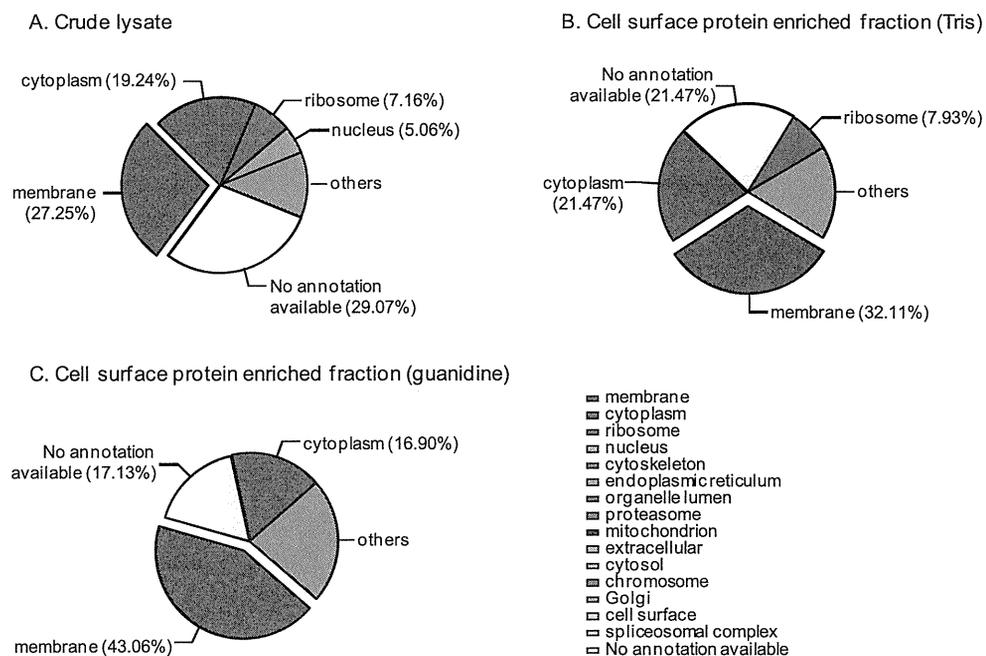
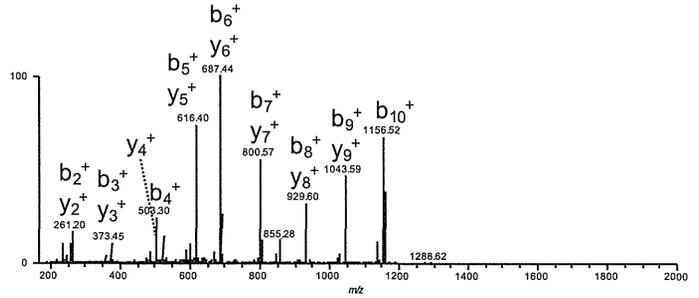
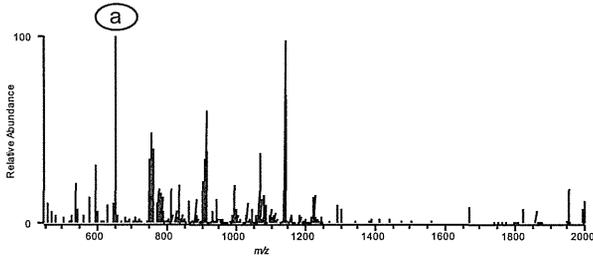


図2 Sequest 検索ヒットタンパク質の細胞内分布.

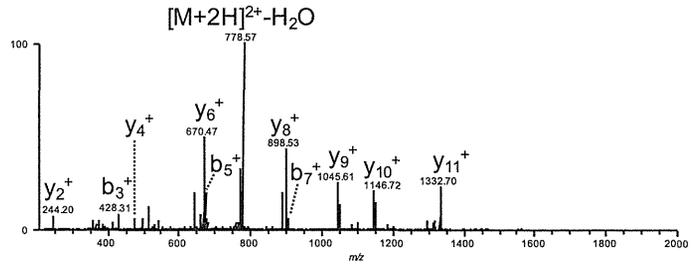
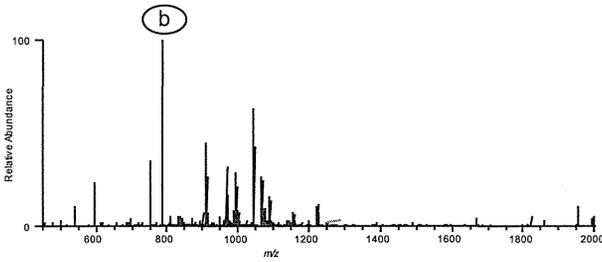
Entry	Accession	position	Sequence	MH+ [Da]	z	m/z	RT [min]	detection		
								crude	Tris	guanidine
intercellular adhesion molecule 1 [Cricetulus griseus]	350539683	290-300	cVLELADQILK	1302.70	2	651.86	124.26	n	y	y
		210-222	QLWTFDLPVTEPK	1573.83	2	787.42	123.14	n	y	y
low-density lipoprotein receptor [Cricetulus griseus]	350540068	335-352	IGYEcLcPNGFQLVDQHR	2207.99	3	736.67	106.59	n	n	y
		429-441	NVVALDTEVANNR	1414.73	2	707.87	64.95	n	y	y
Shared peptide among MHC1 Hm1-C2, Hm1-C4, and Hm1-C5		244-280	EEEEQTQDMELVETRPSGDG TFQK	2783.23	3	928.42	74.64	n	y	y
MHC class I antigen Hm1-C4 [Cricetulus griseus]	345842479	156-169	TWTAADTAAQITQR	1533.77	2	767.39	77.79	n	y	y
		79-89	EGPEYWEEETR	1424.60	2	712.80	68.21	n	y	y
MHC class I antigen Hm1-C5 [Cricetulus griseus]	345842477	268-280	WAAVWVPSGEEQK	1399.73	2	700.37	71.39	n	n	y
		79-89	EGPEYWEGQTR	1351.60	2	676.30	61.68	n	y	y
PREDICTED: neural cell adhesion molecule 1 [Cricetulus griseus]	354472688	60-70	FFLcQVAGEAK	1270.62	2	635.81	97.56	n	y	y
PREDICTED: nucleolin [Cricetulus griseus]	354502803	449-470	NLSFNITEDELKEVFEDALEIR	2624.32	3	875.44	177.63	n	y	y
40S ribosomal protein SA [Cricetulus griseus]	345842370	129-155	ADHQPLTEASYVNLPTIALcNT DSPLR	2997.49	3	999.83	109.89	y	y	n
		64-80	AIVAIENPADVSVISSR	1740.96	2	870.99	82.50	y	y	n
PREDICTED: dystroglycan [Cricetulus griseus]	354476371	795-823	GVPIFADELDDSKPPSSSMP LILQEEK	3152.62	3	1051.54	128.69	n	n	y
		518-533	IPSDTFYDNEDTTTDDK	1861.80	2	931.40	64.72	n	n	y
PREDICTED: chondroitin sulfate proteoglycan 4 [Cricetulus griseus]	354471469	234-247	SQQAPLAFQAGDQR	1516.75	2	758.88	62.02	n	y	y
		715-734	QGAGGVEGTEWWETLAFHQR	2259.07	3	753.69	120.02	n	y	y
		1759-1771	GQLLVSEELHAR	1448.79	2	724.90	69.25	n	y	y
PREDICTED: sulfated glycoprotein 1 [Cricetulus griseus]	354494438	171-185	EAVDSYLPVILDMIK	1705.92	2	853.46	161.51	n	y	y

表 2 同定されたウイルス受容体タンパク質と代表的なペプチド. 各条件で ms/ms による同定が可能な程度に検出されたものを y で, 検出されなかったかまたは量が不十分だったものを n で示す.

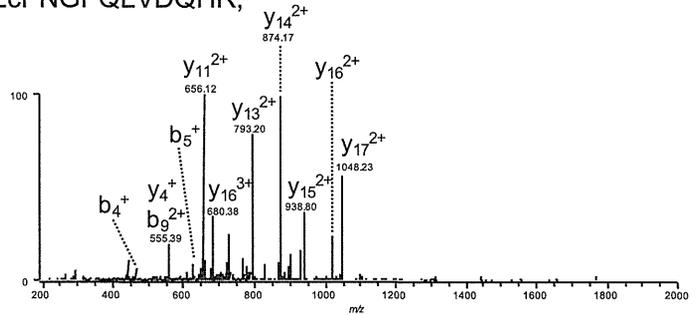
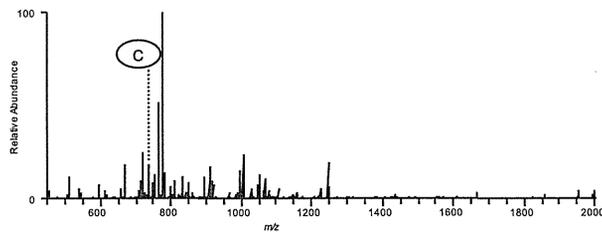
A. intercellular adhesion molecule 1, 290-300, cVLELADQILK,
m/z 651.86, *z* = +2, [MH]⁺ 302.703, RT 124.26 min



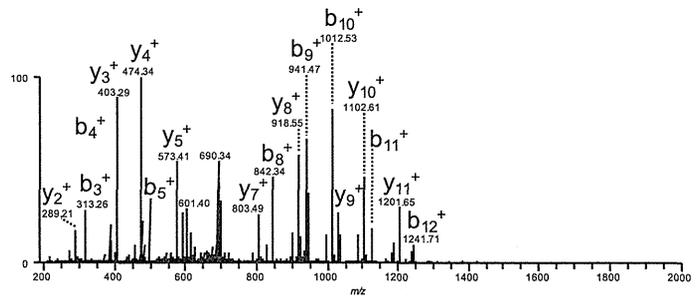
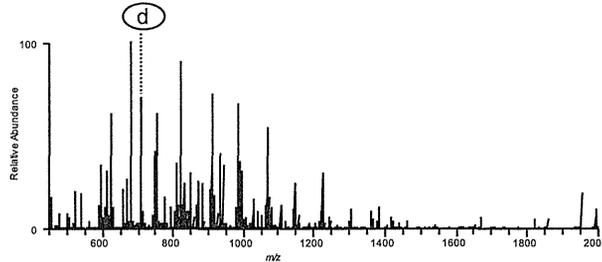
B. intercellular adhesion molecule 1, 210-222, QLWTFDLPVTEPK,
m/z 787.42, *z* = +2, [MH]⁺ 1573.829, RT 123.14 min



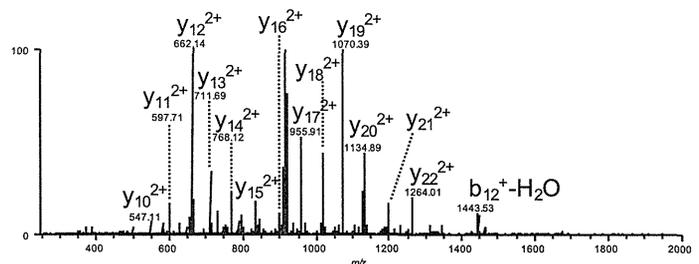
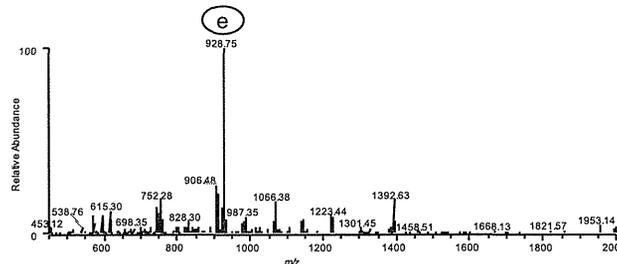
C. low-density lipoprotein receptor, 335-352, IGYEclcPNGFQLVDQHR,
m/z 736.67, *z* = +3, [MH]⁺ 2207.992, RT 106.59 min



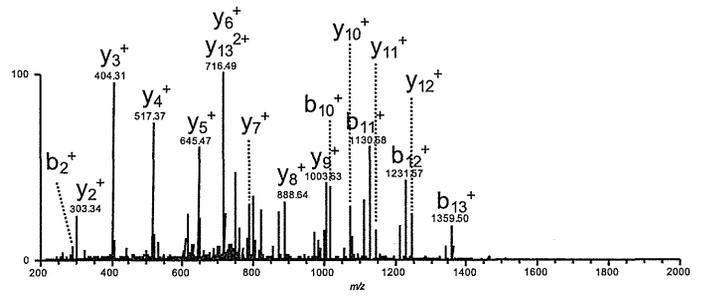
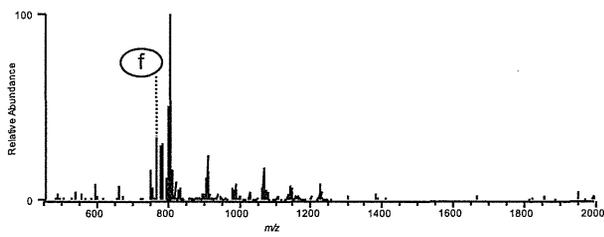
D. low-density lipoprotein receptor, 429-441, NVALDTEVANNR,
m/z 707.87, *z* = +2, [MH]⁺ 1414.734, RT 64.95 min



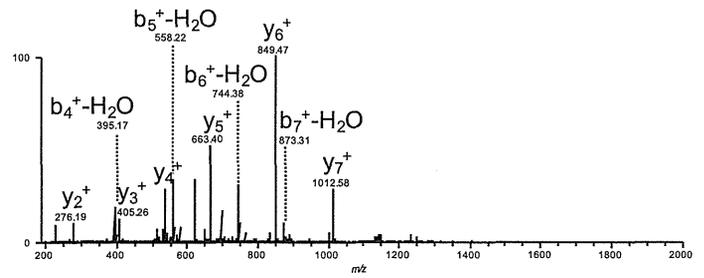
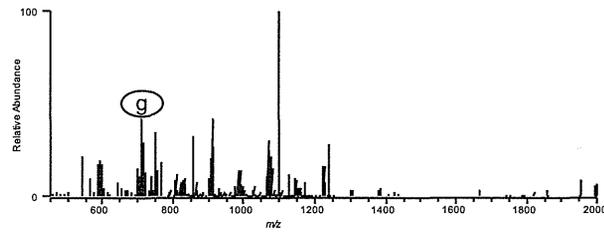
E. Shared peptide among Hm1-C4, Hm1-C5, and Hm1-C2, 244-280, EEEEQTQDMELVETRPSGDGTFQK,
m/z 928.42, *z* = +3, [MH]⁺ 2783.233, RT 74.64 min



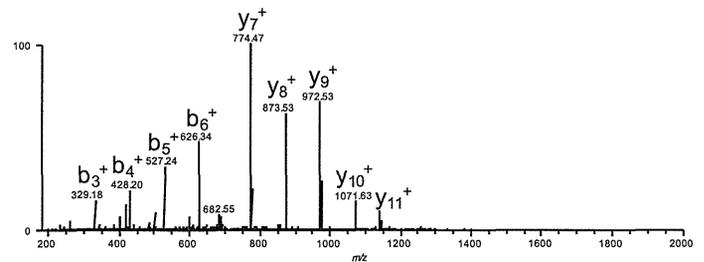
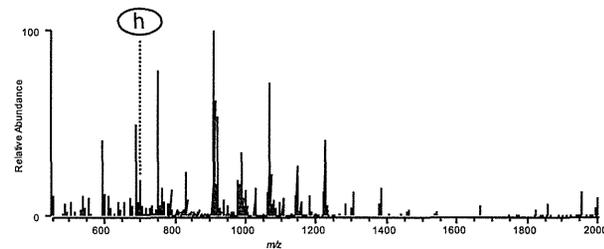
F. MHC class I Hm1-C4, 156-169, TWTAADTAAQITQR,
m/z 767.39, *z* = +2, [MH]⁺ 1533.771, RT 77.79 min



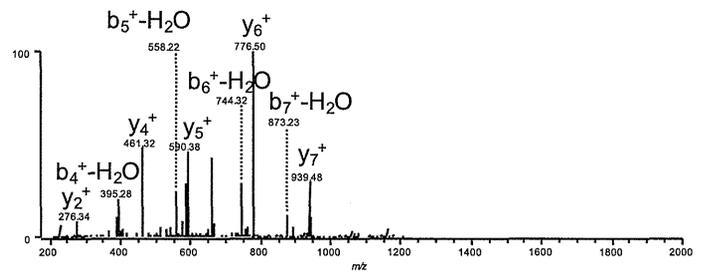
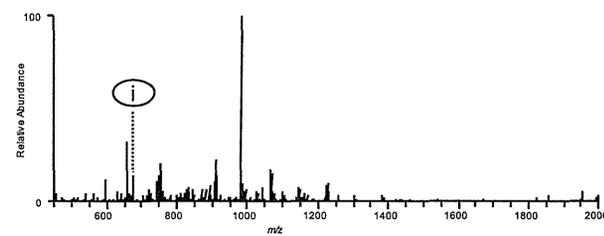
G. MHC class I Hm1-C4, 79-89, EGPEYWEETR,
m/z 712.80, *z* = +2, [MH]⁺ 1424.600, RT 68.21 min



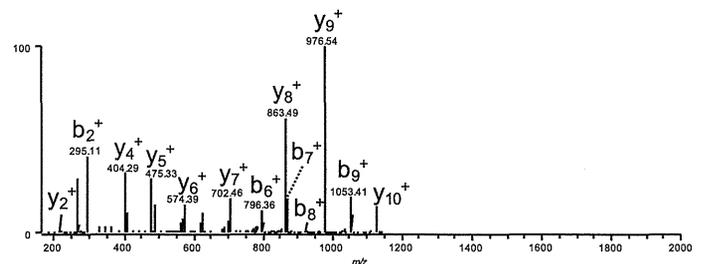
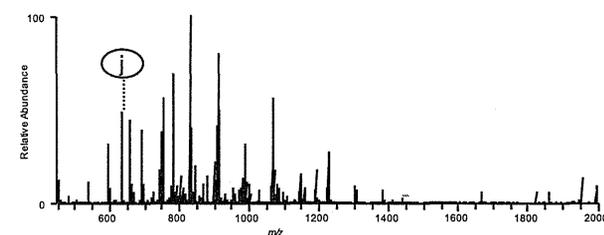
H. MHC class I Hm1-C5, 268-280, WAAVVPSGEEQK,
m/z 700.37, *z* = +2, [MH]⁺ 1399.728, RT 71.39 min



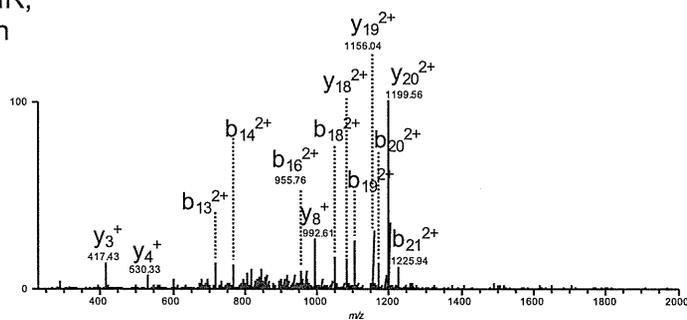
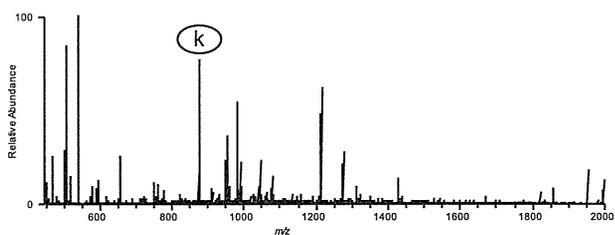
I. MHC class I Hm1-C5, 79-89, EGPEYWEGQTR,
m/z 676.30, *z* = +2, [MH]⁺ 1351.596, RT 61.68 min



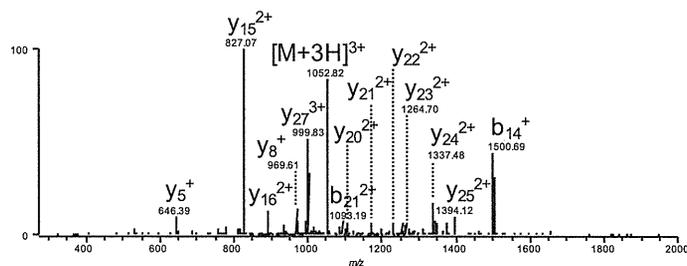
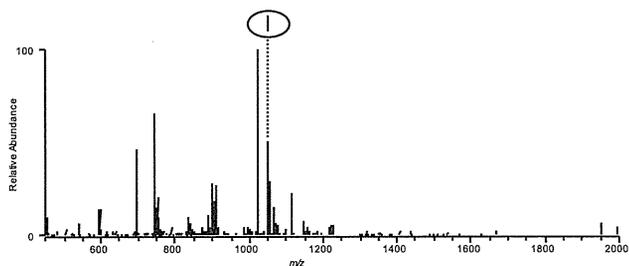
J. neural cell adhesion molecule 1, 60-70, FFLcQVAGEAK,
m/z 635.81, *z* = +2, [MH]⁺ 1270.617, RT 97.56 min



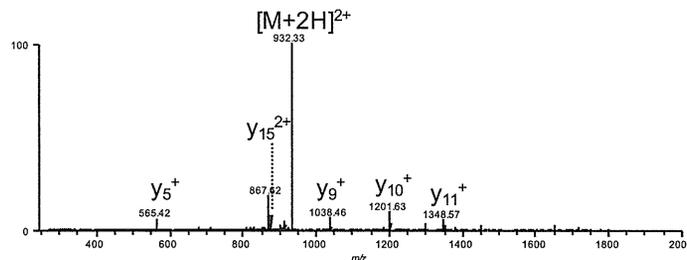
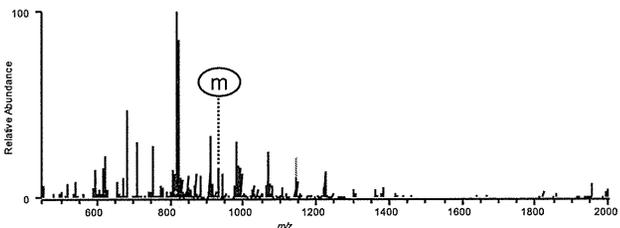
K. nucleolin, 449-470, NLSFNITEDELKEVFEDALEIR,
m/z 875.44, *z* = +3, [MH]⁺ 2624.318, RT 177.63 min



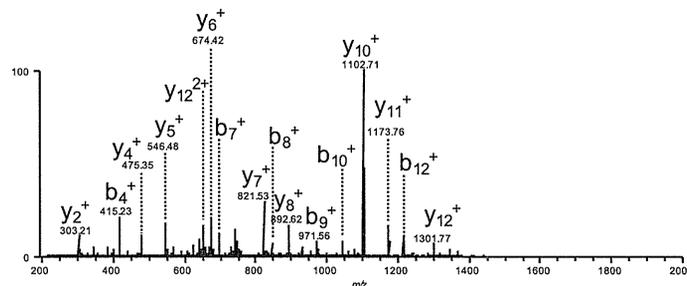
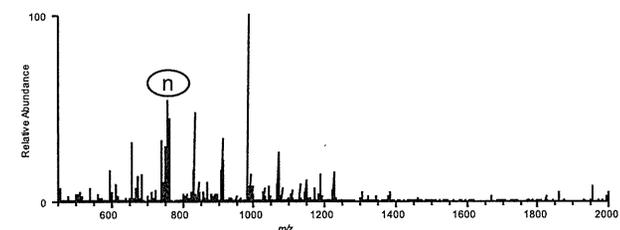
L. dystroglycan, 795-823, GVPIFADELDDSKPPPSSSMPLILQEEK,
m/z 1051.54, *z* = +3, [MH]⁺ 3152.619, RT 128.69 min



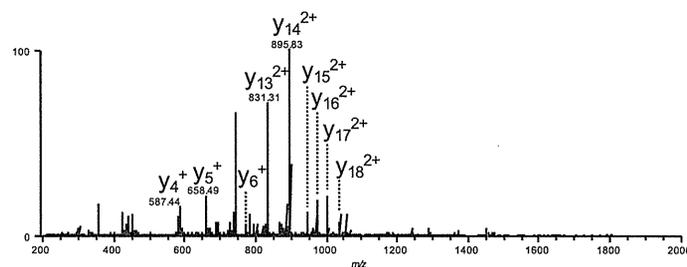
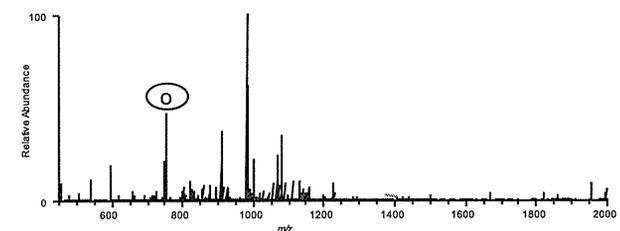
M. dystroglycan, 518-533, IPSDTFYDNEDTTTDK,
m/z 931.40, *z* = +2, [MH]⁺ 1861.800, RT 64.72 min



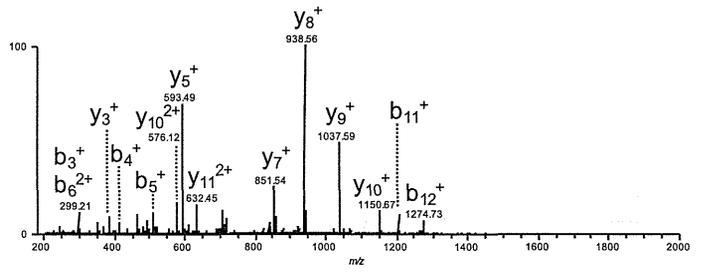
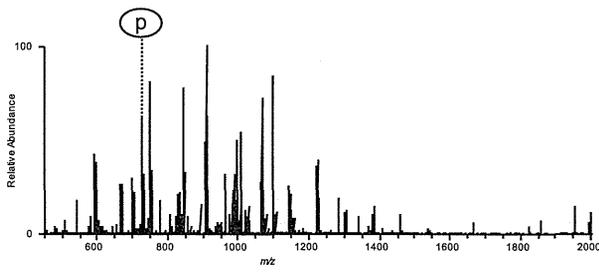
N. chondroitin sulfate proteoglycan 4, 234-247, SQQAPLAFQAGDQR,
m/z 758.88, *z* = +2, [MH]⁺ 1516.755, RT 62.02 min



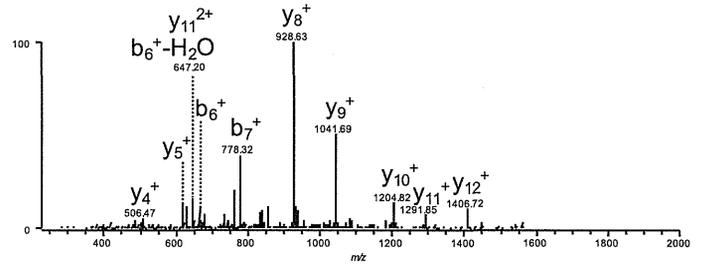
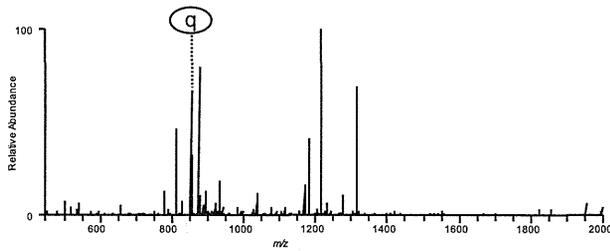
O. chondroitin sulfate proteoglycan 4, 715-734, QGAGGVEGTEWWETLAFHQR,
m/z 753.69, *z* = +3, [MH]⁺ 2259.066, RT 120.02 min



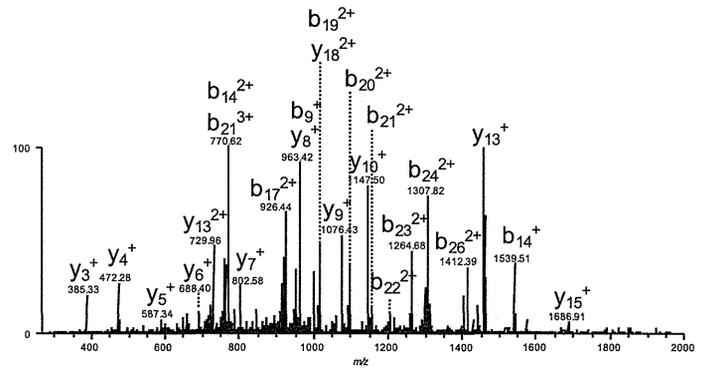
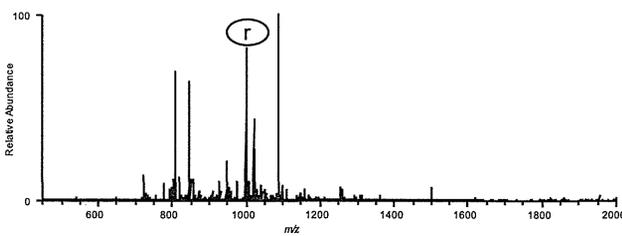
P. chondroitin sulfate proteoglycan 4, 1759-1771, GQLLVSEEPLHAR,
m/z 724.90, *z* = +2, [MH]⁺ 1448.791, RT 69.25 min



Q. sulfated glycoprotein 1, 171-185, EAVDSYLPVILDMIK,
m/z 853.46, *z* = +2, [MH]⁺ 1705.920, RT 161.51 min



R. 40S ribosomal protein SA, 129-155, ADHQPLTEASYVNLPTIALcNTDSPLR,
m/z 999.83, *z* = +3, [MH]⁺ 2997.488, RT 109.89 min



S. 40S ribosomal protein SA, 64-80, AIVAIENPADVSVISSR,
m/z 870.99, *z* = +2, [MH]⁺ 1740.963, RT 82.50 min

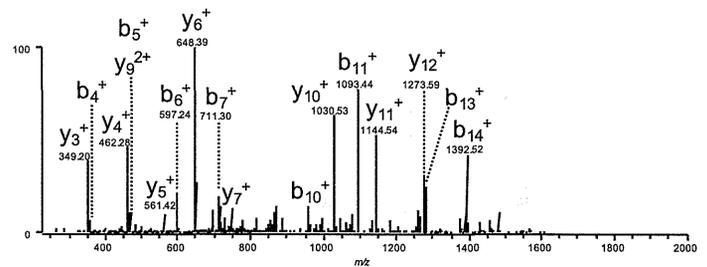
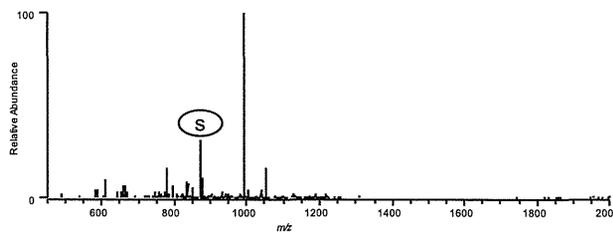


図 3 同定されたウイルス受容体タンパク質の代表的なペプチドの質量スペクトルと *ms/ms* スペクトル. 40 S ribosomal protein SA 由来のペプチド(R, S)は crude lysate, 他は細胞表面タンパク質濃縮画分(guanidine buffer)のスペクトルより抜粋.

分担研究報告書

ヒトレトロウイルスの感染リスク分析に関する研究

研究分担者 前田洋助 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

研究要旨

ウイルス産生細胞内での HTLV-1 エンベロープタンパク質の gp46 とその受容体である GLUT1 の挙動について解析を行った。GLUT1 の過剰発現により細胞表面への GLUT1 の発現ならびにレトロウイルス粒子内取り込みは増大し、その結果として gp46 の膜融合能が減弱することが判明した。また GLUT1 とその相同分子である GLUT3 とのキメラ分子による解析により、GLUT1 の 6 番目の細胞外ドメインを含む領域が細胞融合阻止に重要であることを明らかにした。さらに V-ATPase 阻害剤を使用した実験から通常レベルの発現では GLUT1 が gp46 とは異なる細胞内コンパートメントに局在することにより gp46 が GLUT1 との会合を逃れて粒子内へ取り込まれて膜融合能が保持されることが示唆された。

A. 研究目的

後天性免疫不全症候群（AIDS）を引き起こすヒトレトロウイルスである HIV-1 はそのアクセサリ遺伝子産物である Nef や Vpu により受容体分子である CD4 をウイルス産生細胞表面からダウンレギュレーション、プロテアソームでの分解を促進することにより感染性のウイルスを産生し、cell-free ないし cell-cell 間の感染系で感染が拡大する。一方成人 T 細胞白血病（ATL）を引き起こすヒトレトロウイルスである HTLV-1 の感染は母乳中に存在する感染細胞から標的細胞への cell-cell 間の感染を主体として感染が拡大する。したがって母乳中に存在する HTLV-1 感染細胞の制御がその感染阻止には重要であると考えられる。HTLV-1 の標的細胞への吸着・侵入にはウイルスエンベロープタンパク質 (Env) の gp46 と受容体分子である GLUT1 との会合が重要であることが判明しているが、一方で GLUT1 の発現が感染後ウイルス産生細胞

内でどのように制御されているかについての報告はない。HTLV-1 の標的細胞である CD4 陽性の T リンパ球では GLUT1 分子の細胞表面発現は低いことが報告されていることから、感染した細胞での gp46 の発現レベルが GLUT1 の発現を凌駕すればその感染性が獲得される可能性もあるが、実際にはどのような機序でその感染性を保持しているのかは知られていない。そこで本研究では両者の分子のウイルス産生細胞内での挙動を解析することにより、ウイルス産生細胞内での HTLV-1 の感染性の獲得機序を明らかにし、その感染制御戦略を構築する基礎的研究基盤を確立することを目的とする。

B. 研究方法

293T 細胞に Env(-) の HIV-1 と HTLV-1 Env を発現させて HTLV-1 Env を有するレトロウイルス粒子を産生させてウイルス産生細胞とし、Luciferase 遺伝子をレポーターとして保持している TZM-bl 細胞と共培養することにより

gp46 を介した cell-cell 間の膜融合能を評価した。また intron で分断されたレポーター遺伝子である inGLuc を有するレトロウイルスベクターを使用して cell-cell 間の感染における標的細胞への感染効率を評価する系を確立した。また cell-free の感染能についてもレポーター遺伝子として Luciferase を組み込んだレトロウイルスを作製して評価した。レトロウイルス粒子内への gp46 ならびに GLUT1 の取り込みは Western Blot により確認した。また両分子のウイルス産生細胞表面並びに細胞内コンパートメントへの挙動についてはフローサイトメトリー、共焦点レーザー顕微鏡、共免疫沈降法により解析した。

C. 研究結果

まず GLUT1 の発現が低い 293T をウイルス産生細胞として使用した場合、gp46 を介した細胞-細胞間融合能、細胞-細胞間感染能、感染性粒子の産生能は保持されていることを確認した。そこで gp46 を介した感染性が GLUT1 の強制過剰発現によりどのような影響をうけるか検討したところ、GLUT1 容量依存的にその感染性が減弱することが判明した。また GLUT1 の相同分子である GLUT3 ではその減弱が観察されなかったことから、この膜融合阻止は GLUT1 特異的であった。逆に 293T 細胞から内因性 GLUT1 をノックダウンするとその感染性は増強した。さらに gp46 による細胞膜融合阻止に関与する GLUT1 の領域を明らかにするため、GLUT3 とのキメラ分子を作製し、その責任領域を決定した。その結果、GLUT1 の 6 番目の細胞外ドメイン (ECL6) を含む領域が重要であることが判明した。また GLUT1 の過剰発現によりレトロウイルス粒子内への GLUT1 の取り込みが促進され、逆に gp46 の取り込みは減弱することが判明した。

次に細胞表面および細胞内での GLUT1 と gp46 の会合について検討した。内因性の GLUT1 の発現は 293T 細胞では低く抑えられており、また共焦点レーザー顕微鏡の解析から gp46 の細胞内局在とは異なる細胞内の特定のコンパートメントに局限していることが判明した。共免疫沈降法でも両者の結合は非常に弱いことを確認した。

次に V-ATPase 阻害剤である Bafilomycin A1 (BFLA1) が細胞内コンパートメントに存在している GLUT1 を細胞表面へ移動させることが報告されていたため、BFLA1 の gp46 膜融合能ならびに感染性に与える影響について解析を行った。まず BFLA1 処理により 293T 細胞の GLUT1 の発現が細胞内から表面へ移動していることをフローサイトメトリーで確認した後、ウイルス産生細胞の BFLA1 処理による感染性への影響について解析を行った。その結果、BFLA1 は gp46 を介した cell-cell 間の膜融合能、cell-cell 間の感染、cell-free の感染のすべてを阻害することが判明した。さらに BFLA1 によりウイルス産生細胞での gp46 と GLUT1 の会合が増強することが共免疫沈降法にて確認された。また BFLA1 処理により両分子がレトロウイルス粒子内に取り込まれることも確認した。

D. 考察

本研究から GLUT1 の過剰発現が gp46 の膜融合活性を減弱させること、その活性には GLUT1 の 6 番目の細胞外ドメインを含む領域が重要であることを示した。この領域は HTLV-1 の吸着・侵入にも重要な領域であることが報告されており、ウイルス産生細胞内でも GLUT1 と gp46 が会合しうることを示している。しかしながら通常レベルの GLUT1 発現ではほとんどの GLUT1 は gp46 とは異なる細胞内コンパートメントに

限局しており, gp46 は GLUT1 と会合することなく膜融合能を保持した状態でウイルス産生細胞表面に輸送されるものと考えられる。しかしながら HIV-1 と同様に受容体分子である GLUT1 の細胞表面への発現をウイルス側因子により積極的に抑制している可能性も現時点では否定できない。今後 GLUT1 細胞表面発現の阻止に関与する HTLV-1 のウイルス側遺伝子産物の関与についても検討していきたい。また本研究の進展によりウイルス感染細胞での GLUT1 と gp46 との会合を誘導して HTLV-1 感染を阻止するような薬剤の開発にもつながる可能性があると考えている。

E. 結論

ウイルス産生細胞内においては HTLV-1 Env の gp46 とその受容体分子である GLUT1 は異なる細胞内コンパートメントに局在することによりウイルス産生細胞において HTLV-1 の感染性が保持されている可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yuan Y, Yokoyama K, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato Y, Yusa K. Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1_{JR-FL} to maraviroc. *Plos One* 2013; 8: e65115.
- 2) Suzuki K, Hattori S, Marks K, Ahlenstiel C, Maeda Y, Ishida T, Millington M, Boyd M, Symonds G, Cooper DA, Okada S, Kelleher A. Promoter targeting RNA suppresses HIV-1 infection in vivo through transcriptional gene silencing.

Molecular Therapy Nucleic Acids in press

- 3) Nakano Y, Monde K, Terasawa H, Yuan Y, Yusa K, Harada S, Maeda Y. Preferential recognition of monomeric CCR5 expressed in cultured cells by the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 for the entry of R5 HIV-1. *Virology in press*
 - 4) Maeda Y, Terasawa H, Nakano Y, Monde K, Yusa K, Oka S, Takiguchi M, Harada S. V3-independent competitive resistance of a dual-X4 HIV-1 to the CXCR4 inhibitor AMD3100. *Plos One in press*
 - 5) 遊佐敬介, 前田洋助, 高林誠, 小林哲, 苑宇哲. CHO細胞が産生するレトロウイルス様粒子とウイルス安全性. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2013; 44: 852-6.
 - 6) 前田洋助. ケモカイン受容体変異と HIV感染抵抗性. 化学療法の領域 2013; 29: 2466-73.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Terasawa H, Maeda Y, Nakano Y, Monde K, Kawano R, Yusa K, Harada S. Competitive resistance of a CXCR4-using HIV-1 lacking amino acid substitutions in the V3 loop of gp120 to a CXCR4 inhibitor. XIV Kumamoto AIDS seminar; 2013; Kumamoto, Japan.
 - 2) Nakano Y, Maeda Y, Monde K, Terasawa H, Yusa K, Harada S. Preferential recognition of monomeric forms of CCR5 by HIV-1 envelope